

Detección de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA) en suero de perros con enfermedad inflamatoria intestinal

El diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) canina es complejo, siendo necesario llevar a cabo un completo protocolo diagnóstico de exclusión. El objetivo del presente estudio es evaluar la presencia de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA) en suero de perros con EII para conocer la utilidad diagnóstica de los mismos en esta enfermedad del perro.

Palabras clave: Enfermedad inflamatoria intestinal, perro, anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo, ANCA.
Clin. Vet. Peq. Anim, 27 (2): 121-126, 2007

C. Mancho, F. Rodríguez-Franco, M. García-Sancho, M. A. Tesouro y A. Sainz

Servicio de Gastroenterología y Endoscopia.
Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Hospital Clínico Veterinario. UCM.

Introducción

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) engloba un conjunto de enfermedades caracterizadas por la presencia de signos gastrointestinales persistentes o recurrentes, con evidencia histológica de inflamación intestinal. La etiología de este conjunto de enfermedades es desconocida, siendo una de las causas propuestas un defecto en la inmunorregulación a nivel intestinal. Esta patología se asemeja a la enfermedad inflamatoria intestinal en el hombre¹. La sintomatología de este grupo de enfermedades se caracteriza por la aparición de vómito, diarrea y pérdida de peso de carácter crónico. Debido a esta sintomatología tan inespecífica el diagnóstico es complejo y se alcanza excluyendo siempre cualquier otra posible causa de enteritis. Por tanto, para diagnosticar EII se ha de someter al perro a un protocolo diagnóstico con el fin de descartar posibles causas de inflamación intestinal. Dentro de este protocolo es necesario incluir: hemograma, bioquímica sanguínea, análisis parasitológico de las heces, pruebas de maldigestión y técnicas de diagnóstico por imagen (radiología y ecografía). Finalmente se hace necesaria la toma de biopsias de mucosa intestinal, para lo que se recurre por lo general a la endoscopia^{1,2}.

En medicina humana el procedimiento diagnóstico de la EII es muy similar al empleado en veterinaria, pero además, en los últimos años, se están empleando marcadores séricos para el diagnóstico y clasificación de este grupo de enfermedades. Unos de los marcadores más relevantes son los anticuerpos anti-citoplasma del neutrófilo o ANCA. Los ANCA son anticuerpos circulantes dirigidos principalmente contra constituyentes de los gránulos de los neutrófilos. Fueron inicialmente descritos en pacientes con vasculitis sistémicas primarias. Sin embargo, estos anticuerpos también se han observado en otras patologías inflamatorias de carácter crónico, tales como la EII. Dentro de esta enfermedad en el hombre se diferencian clásicamente dos entidades: la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. En ambas patologías se ha detectado la presencia de estos anticuerpos, siendo más frecuente su aparición en enfermos con colitis ulcerosa (70-80%) que en pacientes con enfermedad de Crohn (10-20%)³⁻⁵.

En medicina humana los ANCA se han empleado como una herramienta diagnóstica más para el diagnóstico de la EII y, en especial, como marcador, para diferenciar la EII de otras en-



fermedades gastrointestinales⁸. Estos anticuerpos también son útiles para hacer un diagnóstico diferencial entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn^{3,9}, aunque para aumentar la utilidad de la detección de ANCA se recomienda combinarla con la detección de otros marcadores serológicos, principalmente con los anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)^{5,7,10}.

Los antígenos frente a los que se dirigen estos anticuerpos se conocen bien en el caso de las vasculitis primarias, pero no sucede lo mismo en la EII. En esta enfermedad se han propuesto gran variedad de antígenos sin haberse descrito ninguna especificidad principal. Además, se ha comprobado que en un mismo suero de un paciente humano con EII pueden coexistir ANCA con diferentes especificidades^{4,6}.

La causa por la que aparecen estos anticuerpos se desconoce. Recientemente se han postulado dos teorías: la infección por un superantígeno microbiano (potentes estimuladores de la respuesta inmunitaria que derivan de bacterias, virus, parásitos o levaduras) y la existencia de alteraciones en el proceso de la apoptosis o en la eliminación de células apoptóticas^{6,7}.

La relación entre la presencia de ANCA y la actividad de la EII es controvertida. Algunos estudios no apoyan esta relación^{11,12}, mientras que otros muestran la existencia de una correlación entre la titulación de estos anticuerpos y la actividad de la colitis ulcerosa, sin encontrar correlación en la enfermedad de Crohn³. Además, la presencia de estos anticuerpos se ha asociado con un tipo de enfermedad más refractaria al tratamiento y con la temprana necesidad de tratamiento quirúrgico⁷.

La metodología de trabajo más empleada en la actualidad para la detección de los ANCA es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre neutrófilos fijados con etanol. Se distinguen distintos patrones, dependiendo de la carga y la distribución citoplásmica de los antígenos reconocidos por los ANCA, siendo los principales patrones el citoplasmático y el perinuclear^{7,10}. En la EII, el patrón más frecuentemente hallado es el perinuclear³, sin conocerse de forma certera los antígenos diana de dichos anticuerpos. También está descrita la aparición de un patrón de fluorescencia "atípico" en esta enfermedad⁷.

En medicina veterinaria, únicamente hay publicados dos estudios previos en los que se han detectado ANCA en perros con EII. En el primer estudio emplearon 39 perros con EII, además de perros sanos, perros sanos de trabajo y pe-

rrros con problemas gastrointestinales crónicos y agudos no asociados a EII. En dicho estudio se empleó como técnica de detección la inmunofluorescencia indirecta (IFI), mediante la que se determinó que el patrón de fluorescencia primordial en la EII del perro fue, como en medicina humana, el perinuclear¹³. En el segundo estudio se evaluó el estado ANCA en 26 perros con EII antes y después de un ciclo de tratamiento de inmunosupresión, determinando que el estado ANCA no está relacionado con la actividad de la enfermedad en el perro¹⁴.

El objetivo del presente estudio es evaluar el uso de la inmunofluorescencia indirecta, para la detección de ANCA, en perros con enfermedad inflamatoria intestinal y comparar la presencia de estos anticuerpos en perros con enfermedad inflamatoria intestinal con la presencia en otros grupos de animales, para conocer la capacidad diagnóstica de la detección de ANCA en la EII canina.

Materiales y Métodos

Animales

En este estudio se han incluido 349 perros. Estos perros se clasificaron en cinco grupos: perros con EII (107 perros), perros con enfermedad digestiva crónica no asociada a enfermedad inflamatoria crónica intestinal (35), perros con patologías digestivas agudas (27), perros sanos de diferentes razas y edades (54) y perros sanos de trabajo, en concreto de la Policía Nacional (126).

Los perros con enfermedad inflamatoria crónica intestinal fueron diagnosticados siguiendo un protocolo diagnóstico de exclusión que incluyó: una hematología y bioquímica sanguínea, un análisis parasitológico de las heces de 3 días consecutivos, una TLI para comprobar la funcionalidad pancreática y, finalmente, se realizó una gastroduodenoscopia con toma de biopsias de duodeno. Mediante el estudio histopatológico de dichas biopsias se alcanzó el diagnóstico de EII.

Los perros sanos de este estudio no mostraron ningún signo de enfermedad y en la analítica sanguínea no presentaron ningún parámetro alterado.

Entre los 35 perros con patología digestiva crónica no asociada a enfermedad inflamatoria crónica intestinal, 15 fueron diagnosticados de neoplasias en el tracto gastrointestinal, 8 de insuficiencia pancreática exocrina, 7 de procesos parasitarios, 2 fueron diagnosticados de hipotiroidismo, 2 de enfermedades de sacos anales y 1 de gastroenteritis crónica de etiología indeterminada (manejada con dieta).



Figura 1. Perro diagnosticado de enfermedad inflamatoria intestinal.

De los 27 perros con procesos gastrointestinales de naturaleza aguda, en 19 el origen de la gastroenteritis fue un cuerpo extraño y 8 padecieron una gastroenteritis aguda de etiología indeterminada.

Detección de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo

Para la detección de estos anticuerpos se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Inicialmente se procedió al aislamiento de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. Para ello se empleó una solución de diatrizoato (13.8% w/v) y dextrano 500 (8% w/v), (Polymorphprep®) siguiéndose las instrucciones del fabricante. Las células obtenidas se resuspendieron en PBS y se comprobó el contenido en neutrófilos de la solución mediante tinción Diff-Quick®. La solución se repartió en portas que se dejaron secar al aire y, posteriormente, se fijaron en etanol al 96% a 4°C durante 5 minutos. Los portas fueron conservados en congelación hasta el momento de su utilización.

Teniendo en cuenta que el punto de corte en los trabajos publicados en veterinaria fue 1:10, las diluciones de trabajo que empleamos fueron 1:5, 1:10 y 1:20. El proceder de la técnica de IFI siguió los mismos pasos que los empleados por los autores de este trabajo, que consistió en incubaciones de una hora en cámara húmeda y a temperatura ambiente. La primera incubación se hizo con los sueros problema y la segunda con un anticuerpo secundario anti-IgG de perro conjugado con fluoresceína. Se hicieron tres lavados con PBS al final de cada incubación. Finalmente, las preparaciones fueron montadas con glicerina tamponada (Fluoprep®) y evaluadas con un microscopio de fluorescencia.

Una vez reunidos todos los datos se calculó la sensibilidad de la técnica, así como la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo en el grupo de pe-

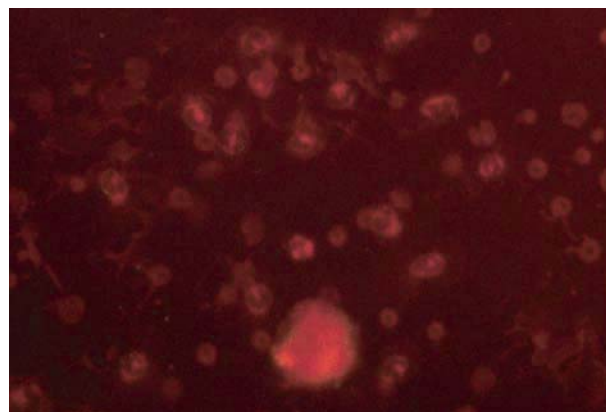


Figura 2. Imagen de inmunofluorescencia indirecta de un suero negativo a ANCA.

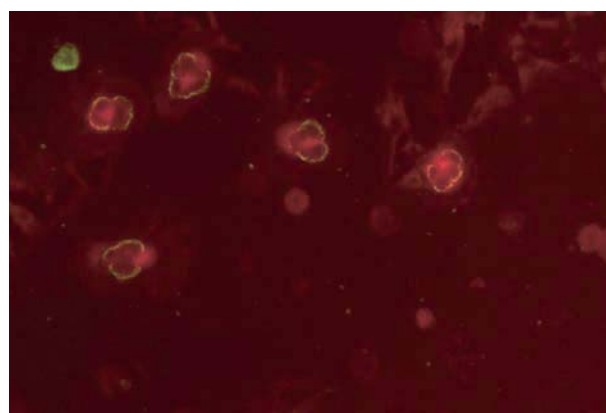


Figura 3. Imagen de inmunofluorescencia indirecta de un suero positivo a ANCA.

rrros con EII, frente al resto de grupos en conjunto y también de forma independiente. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo se calcularon aplicando un intervalo de confianza del 95%.

Resultados

De los 107 perros con EII, 39 fueron ANCA-positivos a dilución 1:5, por lo que la sensibilidad de la técnica fue de 0.36 (0.27-0.46). A dilución 1:10, los perros ANCA-positivos fueron 36, siendo la sensibilidad de 0.34 (0.25-0.43) cuando ponemos el punto de corte a esta dilución. Finalmente, a dilución 1:20, el número de perros con EII ANCA-positivos fue de 19, siendo la sensibilidad a esta dilución de 0.18 (0.11-0.25).

Comparando el grupo de perros con EII con el resto de grupos en conjunto, la especificidad de la técnica de IFI para la detección de ANCA en EII fue de 0.86 (0.82-0.91) cuando

empleamos la dilución 1:5 como punto de corte, de 0.87 (0.83-0.91) cuando empleamos 1:10, y de 0.92 (0.89-0.96) para la dilución 1:20.

Los valores de especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, comparando el grupo de perros con EII, con los 4 grupos estudiados de forma independiente y en conjunto, se muestran en la Tabla 1 para la dilución 1:5, en la Tabla 2 para la dilución 1:10 y en la Tabla 3 para la dilución 1:20.

Discusión

En la actualidad la realización de un diagnóstico de EII en el perro es un proceso largo, complejo y que requiere del empleo de técnicas que precisen de la anestesia del perro, como la endoscopia con toma de biopsias intestinales. Por ello, el desarrollo de otras técnicas diagnósticas no invasivas, como los marcadores séricos, supondría un paso importante como ayuda al diagnóstico de este grupo de enfermedades.

1:5	+	-	Especificidad (95% I.C.)	VP+ (95% I.C.)	VP- (95% I.C.)
Sanos	8	46	0,85 (0,76-0,95)	0,83 (0,72-0,94)	0,4 (0,31-0,49)
Trabajo	18	108	0,86 (0,8-0,92)	0,68 (0,56-0,8)	0,61 (0,54-0,69)
Cuadro agudo	3	24	0,89 (0,77-1)	0,93 (0,85-1)	0,26 (0,17-0,35)
Cuadro crónico no EII	4	31	0,89 (0,78-0,99)	0,91 (0,82-0,99)	0,31 (0,22-0,4)
Total (grupos juntos)	33	209	0,86 (0,82-0,91)	0,54 (0,43-0,66)	0,75 (0,7-0,81)

VP+: Valor predictivo positivo; VP-: Valor predictivo negativo

Tabla 2. Resultados empleando la dilución 1:5 como punto de corte.

1:10	+	-	Especificidad (95% I.C.)	VP+ (95% I.C.)	VP- (95% I.C.)
Sanos	8	46	0,85 (0,76-0,95)	0,82 (0,7-0,93)	0,39 (0,3-0,48)
Trabajo	18	108	0,86 (0,8-0,92)	0,67 (0,54-0,79)	0,6 (0,53-0,48)
Cuadro agudo	3	24	0,89 (0,77-1)	0,92 (0,84-1)	0,25 (0,17-0,34)
Cuadro crónico no EII	2	33	0,94 (0,87-1,02)	0,95 (0,88-1)	0,32 (0,23-0,41)
Total (grupos juntos)	31	211	0,87 (0,83-0,91)	0,54 (0,42-0,66)	0,75 (0,7-0,8)

VP+: Valor predictivo positivo; VP-: Valor predictivo negativo

Tabla 2. Resultados empleando la dilución 1:10 como punto de corte.

1:20	+	-	Especificidad (95% I.C.)	VP+ (95% I.C.)	VP- (95% I.C.)
Sanos	5	49	0,91 (0,83-0,98)	0,79 (0,63-0,95)	0,36 (0,28-0,44)
Trabajo	13	113	0,9 (0,84-0,95)	0,59 (0,42-0,76)	0,56 (0,49-0,63)
Cuadro agudo	0	27	1 (1-1)	1 (1-1)	0,23 (0,16-0,31)
Cuadro crónico no EII	1	34	0,97 (0,92-1)	0,95 (0,85-1)	0,28 (0,2-0,36)
Total (grupos juntos)	19	223	0,92 (0,89-0,96)	0,5 (0,34-0,6)	0,72 (0,67-0,77)

VP+: Valor predictivo positivo; VP-: Valor predictivo negativo

Tabla 3. Resultados empleando la dilución 1:20 como punto de corte.

Para el diagnóstico de la EII en el hombre, dos de los marcadores séricos más empleados son los anticuerpos frente al citoplasma del neutrófilo (ANCA) y frente a *Saccharomyces cerevisiae*. En medicina veterinaria únicamente hay un estudio previo que evalúa la presencia de ANCA en perros con EII¹³. En dicho estudio se empleó la dilución 1:10 con una especificidad que osciló entre 0.82 y 0.95 en perros sanos, en perros con problemas gastrointestinales agudos y en perros con patologías gastrointestinales crónicas no asociadas a EII. La sensibilidad de la técnica en dicho estudio fue de 0.51. Si comparamos estos datos con los obtenidos en nuestro trabajo empleando esa misma dilución, observamos que la sensibilidad en nuestro estudio es menor (0.34 (0.25-0.43)), si bien la especificidad es muy similar, oscilando entre 0.85 y 0.94 en los distintos grupos.

En nuestro trabajo hemos empleado tres diluciones de los sueros para la detección de ANCA. Al analizar los resultados se observa que la sensibilidad de la técnica a la dilución 1:20 (0.18) es muy inferior a la de las otras dos diluciones. Tras comparar los resultados obtenidos al emplear la dilución 1:5 y 1:10, los valores de sensibilidad son muy similares entre sí (0.36 y 0.34 respectivamente), si bien al establecer el punto de corte en 1:10, la especificidad de la técnica mejora, en especial, al compararla con el grupo de perros con cuadro crónico digestivo no asociado a EII.

En los resultados de nuestro estudio destaca que, tanto a diluciones altas como bajas, los mayores valores de especificidad y valor predictivo positivo se encuentran al comparar a los perros con EII con los dos grupos de animales con cuadro digestivo no asociado a EII. Estos datos podrían indicar la utilidad de los ANCA para diferenciar la EII de otras enfermedades gastrointestinales no asociadas a esta entidad, como ya se ha descrito en humana⁸.

La conclusión alcanzada en este trabajo es que la sensibilidad de la IFI para la determinación de ANCA en perros con EII es baja, pero la especificidad para el diagnóstico de la EII es elevada, especialmente en perros con sintomatología digestiva. Finalmente, la detección de ANCA podría incluirse en los protocolos diagnósticos de la EII, como una prueba más para la distinción de esta enfermedad de otras patologías digestivas de sintomatología similar.

Agradecimientos

Agradecemos a los veterinarios del Cuerpo Nacional de Policía, Gloria Giménez (Facultativa Veterinaria) y Silvestre Galera, su colaboración en este estudio.

Title

Detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in serum from dogs with inflammatory bowel disease

Summary

Canine inflammatory bowel disease (IBD) is a group of diseases characterized by chronic gastrointestinal signs and histologic evidence of intestinal inflammation on biopsy material. Diagnosis is complex and laborious and requires ruling out any other diseases that may cause intestinal inflammation. In last years, human medicine is using serologic markers as the anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). The aim of this study is to assess the use of an immunofluorescent antibody test (IFA) assay for detection of ANCA in dogs with IBD, comparing the presence of these antibodies in dogs with IBD with its presence in healthy dogs, healthy working dogs, dogs with acute gastrointestinal disorders and dogs with chronic non-IBD associated gastrointestinal disorders. The sensitivity and specificity of the IFA test for detection of ANCA in IBD were 0.34 and 0.87 respectively, when group of dogs with IBD was compared with all the others groups. The specificity was 0.94 when the group of dogs with IBD was compared with dogs with chronic non-IBD associated gastrointestinal disorders. Detection of ANCA appears to be useful as a diagnostic tool that could help to distinguish IBD from others gastrointestinal diseases with similar clinical signs.

Key words: inflammatory bowel disease, dog, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA.

Bibliografia

1. Hall EJ and German AJ: Diseases of the small intestine. En: Ettinger SJ and Feldman EC (ed): Textbook of veterinary internal medicine. St. Louis, Elsevier Saunders (6^a Ed.) 2005: 1332-1378.
2. Guilford WG: Idiopathic Inflammatory Bowel Diseases. En: Strombeck DR (ed): Strombeck's small animal gastroenterology. Philadelphia, WB Saunders Company (3^a Ed), 1996; 451-486.
3. Abad E, Tural C, Mirapeix E, Cuxart A: Relationship between ANCA and clinical activity in inflammatory bowel disease: variation in prevalence of ANCA and evidence of heterogeneity. *J Autoimmun* 1997; 10: 175-180.
4. Roozendaal C, Kallenberg CGM: Are anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) clinically useful in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1999; 116(2): 206-213.
5. Sandborn WJ: Serologic markers in inflammatory bowel disease: State of the art. *Rev Gastroenterol Disord* 2004; 4(4): 167-174.
6. Reumaux D, Duthilleul P, Roos D: Pathogenesis of diseases associated with antineutrophil cytoplasm autoantibodies. *Hum Immunol* 2004; 65: 1-12.
7. Reumaux D, Sendid B, Duthilleul P, Dewit O, Colombel JF: Serological markers in inflammatory bowel diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 19-35.
8. Duerr RH, Targan SR, Landers CJ et al.: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis: comparison with other colitides/diarrheal illness. *Gastroenterology* 1991; 100: 1590-1596.
9. Bartunková J, Kolarová A, Sedivá A, Holzelová E: Antineutrophil cytoplasmic antibodies, anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies, and specific IgE to food Allergens in children with inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2002; 102: 162-168.
10. Saibeni S, Folli C, Franchis R, Borsi G, Vecchi M: Diagnostic role and clinical correlates of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in Italian patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis* 2003; 35(12): 862-868.
11. Cambridge G, Rampton DS, Stevens TR, McCarthy DA, Kamm M, Leaker B: Anti-neutrophil antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1992; 33: 668-674.
12. Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S: A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86(2): 202-210.
13. Allenspach K, Luckschander N, Styner M et al.: Evaluation of assays for perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibodies and antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in dogs with inflammatory bowel disease. *Am J Vet Res* 2004; 65: 1279-1283.
14. Luckschander N, Allenspach K, Hall J, Seibold F, Gröne A, Doherr M, Gaschen F: Perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibody and response to treatment in diarrheic dogs with food responsive disease or inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med* 2006; 20(2): 221-227.